

A *Rhizobium phaseoli* szaporodása néhány magyarországi talajban különböző hőmérsékleti körülmények között

S. H. SALEM és SZEGI JÓZSEF

Ain Shams Egyetem Mezőgazdasági Karának Mikrobiológiai Tanszéke, Kairo, EAK és MTA Talajtani és Agro-kémiai Kutató Intézete, Budapest

Az irodalomból közismert, hogy a rhizobiumok, a többi spórát nem képező baktériumhoz hasonlóan, érzékenyek a környezeti hatásokkal szemben. A hőmérséklet, az antagonizmus a bakteriofágok stb. másként fejtik ki hatásukat mesterséges tápközegben és másként a talajban, ahol az ökológiai faktorok hatásait a talaj fizikai, kémiai és biológiai sajátosságai lényeges mértékben befolyásolják. Bár az irodalomban számos publikáció található, amely a rhizobiumok hőmérsékleti érzékenységevel kapcsolatos, azonban a vizsgálatok túlnyomó többségét „in vitro” körülmények között végezték s kevés figyelmet fordítottak a baktériumok hőérzékenységére talajviszonyok között. ROUGHLEY [12] szerint a tözeg vívőanyaggal készült rhizobiumos oltóanyag csíraszama 26 hétig tartó tárolás hatására sem csökkent, amennyiben a nedvességtartalom állandó maradt. A tárolóhelyiség hőmérséklete 4–26 °C között befolyást gyakorolt a rhizobiumok szaporodására. Ezzel szemben VAN SCHREVEN [14] azt találta, hogy a *Rhizobium meliloti* sejtjeinek száma 3 hónap után, a *Rh. trifolii* csíraszama pedig 2 hónapos tárolás után rohamosan csökken, mind 2 °C-os, mind pedig 28 °C-os hőmérsékleti körülmények között.

A rhizobiumos növényoltással foglalkozó kutatók vizsgálatai arra mutatnak rá, hogy az EAK egyes talajaiban a *Rhizobium phaseolival* történő oltás hatására, illetve annak ellenére sem képződnek gumók a bab növényenél (ABOU EL FADL és munkatársai [2], SALEM [13]. Az előző szerzők szerint ez elsősorban a bakteriofágok és antagonista mikroszervezetek tevékenységével magyarázható.

MAHMOUD és munkatársai [9] más oldalról közelítették meg a kérdést. Az említett talajokból sikerült nekik olyan törzseket kitenyésztetniük, amelyekkel történő oltás hatására, gumóképzést figyeltek meg a bab gyökérzetén, mind homokkultúrában, mind pedig az említett talajokban. Feltételezésük szerint a gumóképzés az előző szerzők kísérleteinél azért maradt el, mivel az oltóanyag nem tartalmazott szimbióta kapcsolatra képes baktériumokat.

Kísérleti rész

Vizsgálataink fő célkitűzését az képezte, hogy megismerjük a *Rhizobium phaseoli* hőérzékenységét 20, 30, 45 °C hőmérsékleten tartott talajmintákban. A kísérletbevont 4 talajtípus a genetikus talajnomenklatúra alapján mészelepe-

1. táblázat

A mikrobiológiai vizsgálat céljára felhasznált talajminták
legfontosabb kémiai adatai

(1) A vizsgált talajok megnevezése	(2) Humusz %	(3) Összes N %	(4) Könnyen felvehető		pH	
			P ₂ O ₅ %	K ₂ O%	H ₂ O	KCl
A) Mészlepedékes csernozjom talaj	3,0	0,185	0,007	0,018	8,4	8,2
B) Barna erdőtalaj	1,4	0,115	0,004	0,022	7,0	6,5
C) Pseudoglejes barna erdőtalaj	1,4	0,092	ny	0,028	7,3	6,6
D) Réti agyagtalaj	6,0	0,297	0,008	0,022	7,8	7,4

dékes csernozjom, barna erdőtalaj, pseudoglejes barna erdőtalaj és réti agyag talajtípusokhoz tartozik. A négy talajtípus legfontosabb kémiai és fizikai adatait az 1. táblázatban mutatjuk be.

A talajokat légszáraz állapotban mozsárban megtörtük és 0,5 mm lyukbőségű szitán átszitáltuk.

A kísérletbevonott effektív *Rhizobium phaseoli* törzset ALLEN [4] által ismertetett élesztőkivonat-mannit tartalmú folyékony tápközegbe vittük, majd 28 °C-on inkubáltuk. 5 nap elteltével a növekedés üteme elérte a maximumot. Ezt a tenyészetet használtuk fel a talajokkal folytatott további vizsgálataink során.

Az ismertetett talajtípusokból 100–100 g-ot mértünk be 250 ml-es Erlenmeyer lombikokba, amelyeket vattadugóval zártunk le. A lombikokat 4 órán át sterilizáltuk 1 atmoszféra nyomáson, majd a talajok steril voltát ellenőriztük. Az egyes lombikokba 20–20 ml rhizobium szuszpenziót vittünk. Ezután a lombikokat rázókészülékbe helyeztük a rhizobiumoknak a talajban történő egyenletes elkeverése céljából.

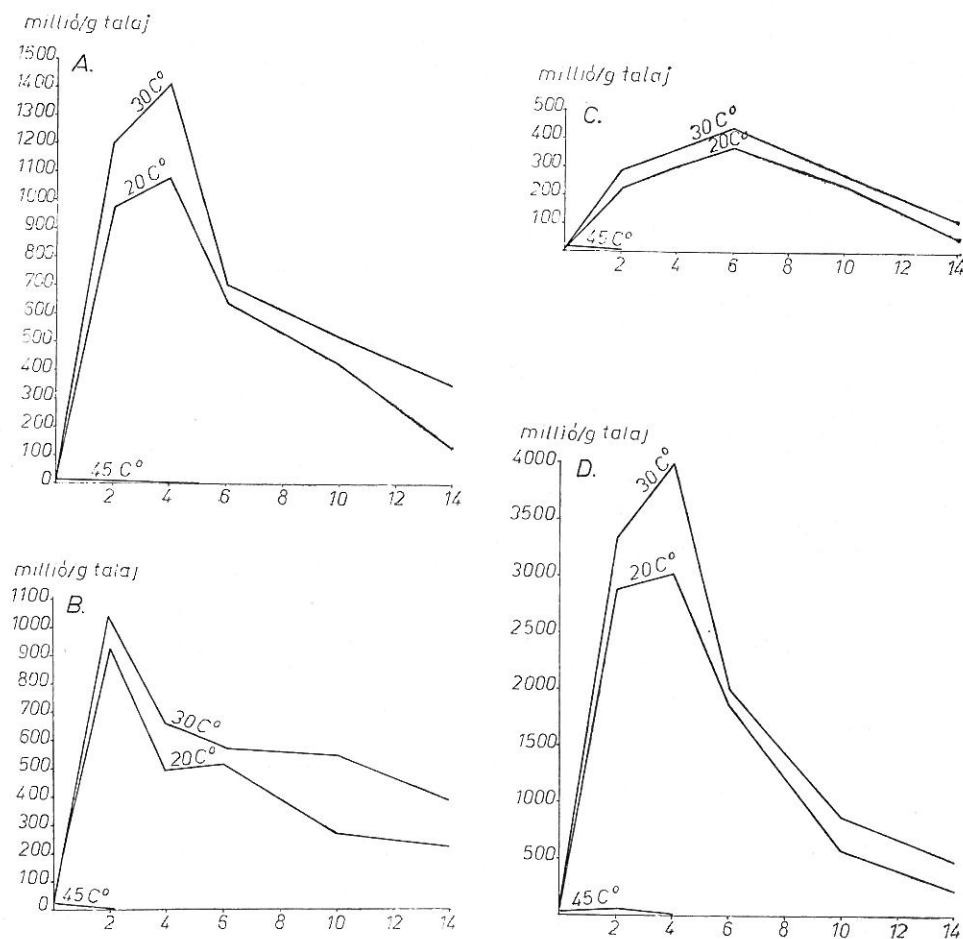
A rhizobiumokkal oltott steril talajokat 20, 30 és 45 °C-os termosztátban inkubáltuk. Minden egyes kezelést négy ismétlésben állítottunk be. A talajok nedvességtartalma a maximális vízkapacitás 60 %-nak volt megfelelő, amelyet az inkubációs idő folyamán steril víz hozzáadásával rendszeresen pótolunk.

A talajokból a rhizobiumok mennyiségi meghatározása céljából a 2-ik, 4-ik, 6-ik, 10-ik és a 14-ik héten mintát vettünk. A steril körülmények között a lombikokból 1–1 gr. talajt használtunk fel amelyet 99 ml steril vizet tartalmazó rázó-lombikba vittük át, s így 1 : 100-as hígítást kaptunk. A talajszuszpenziót ezután 15 percen át ráztuk, majd agarlemezen lemezőntés segítségével meghatároztuk a talajban levő rhizobium sejtek számát. A talajszuszpenziót ezután 105 °C-on bepároltuk, s ennek alapján számítottuk ki pontosan a kivett minta abszolút száraz súlyát s erre számítottuk át a sejtszámot is. A sejtszámlálást LOTFI és FAHMY [8] által ismertetett talajkivonat-mannit tartalmú agarlemezen végeztük. A táptalaj kémhatását pH 6,8-ra állítottuk be. A 4 ismétlésben folytatott vizsgálatok eredményei az 1–4 ábrákban kerülnek bemutatásra.

Az 1/A ábra a *Rhizobium phaseoli* szaporodását reprezentálja a mészlepedékes csernozjom talajban eltérő hőmérsékleti körülmények között. Látható az ábrából, hogy a 20 °C és 30 °C-on beállított kísérleti variánsoknál a sejtszám a beállítást követő 4 hétig ugrásszerűen megnövekedett, majd fokozatosan

csökkent az inkubációs periódus végéig. A barna erdőtalaj esetében, amint azt az 1/B. ábrán láthatjuk, a 20 °C és 30 °C-on inkubált kezeléseknél a maximális szaporodási intenzitás már a második hét végén megfigyelhető volt, ezután a sejtszám fokozatos csökkenését állapítottuk meg. A pseudoglejes barna erdőtalajnál, amelyet az 1/C. ábra mutat be, a maximális szaporodási érték a 6-ik hét végén mutatkozott meg a két variáns esetében. Az 1/D. ábra bemutatja a *Rhizobium phaseoli* szaporodását a réti agyag talajban. A maximális sejtszámot a 4-ik héten figyeltük meg a 20 °C-os és 30 °C-os variánsok esetében, majd ezután a fentiekhez hasonlóan fokozatos csökkenés következett.

A különböző talajtípusok között a legmagasabb sejtszámot a réti agyag-talajban mutattuk ki, amely többszöröse volt akár a barna erdőtalajban, akár



1. ábra

A *Rhizobium phaseoli* sejtszámának alakulása néhány magyarországi talajban. A) Mészlepedékes csernozjom talaj. B) Barna erdőtalaj. C) Pseudoglejes barna erdőtalaj. D) Réti agyagtalaj. Függőleges tengely: A *Rhizobium*ok száma millió/g talaj. Vízszintes tengely: Inkubációs idő hetekben

pedig a pseudoglejes barna erdőtalajban előforduló maximális értékeknek. Ezután a mészlepedékes csernozjom talaj következett, ahol a 20 °C-os kezelésnél a maximális sejtszám 1083 millió, illetve a 30 °C-os kezelésnél 1416 millió. A fentiekből arra lehet következtetni, hogy a két talajtípus viszonylag magas szervesanyagtartalma kedvező feltételeket biztosít a rhizobiumok szaporodásához.

A 45 °C-os hőmérséklet az összes talajtípusok esetében rendkívüli mértékben gátolta a baktériumok szaporodását. A magas hőmérséklet káros hatására FRED és munkatársai [7] is rámutattak, „in vitro” körülmények között végzett kísérleteik során. Az egyes talajtípusok között bizonyos különbségeket lehetett megfigyelni, a sejtek pusztulásának gyorsasága tekintetében. Általában a 10–14 héten már egyik talajtípusban sem sikerült élő sejteket kimutatni. Legtöbb sejtet a réti agyagtalajból mutattuk ki, amelyben a második hét végéig bizonyos szaporodás is megfigyelhető volt. Ugyancsak látható az 1/D. ábrából, hogy a réti talajnál a sejtszám csökkenése valamivel lassabban ment végbe, mint a többi talajokban, s még a 10-ik héten is sikerült jelentős számú élő sejtet megfigyelni.

Eredmények megvitatása

A különböző talajokba vitt *Rhizobium phaseoli* törzs inkubációja során a maximális sejtszám az oltást követő 4-ik, 6-ik héten volt megfigyelhető a 20 °C és 30 °C-on tartott kísérleti variánsok esetében.

Ezen idő eltelte után a sejtszám fokozatosan csökkent az inkubációs periódus végéig. Feltételezhető, hogy a kezdeti gyors szaporodás annak a következménye, hogy az oltáskor a tápanyag forrás nagyobb mennyiségben volt jelen, amelyet a mikroszervezetek fokozatosan felhasználtak. Elképzelhető az is, hogy a hővel történő sterilizálás megnövelte a mikroszervezetek számára felvehető tápanyagok mennyiségét. A fentiekkel magyarázható, hogy a magas szervesanyagtartalmú réti agyag és csernozjom talajokból mutattuk ki a legnagyobb sejtszámot. E két talaj nagy ásványi és szervesanyagtartalma következtében kiváló puffer sajátossággal rendelkezik.

A 20 °C és 30 °C-os hőmérsékleti értékek között lényeges különbség volt megfigyelhető a rhizobiumok szaporodása szempontjából. 20 °C-on a szaporodás intenzitása lényegesen gyengébb, mint 30 °C-on. Hasonló megfigyelésekről közölnek adatokat ALLISON és munkatársai [5] akik megállapították, hogy laboratóriumi körülmények között a csíraszám 15 °C-os hőmérsékleten 25–50 %-át teszi ki a 30 °C-on inkubált tenyészetek csíraszámának.

Kísérleteink azt mutatják, hogy a szaporodás optimális hőmérséklete mind a négy talajtípusnál jóval közelebb van a 30 °C-hoz, mint a 20 °C-hoz. FRED és munkatársai [7], valamint ALLEN és ALLEN [3] a rhizobiumok optimális szaporodási intenzitását 29–31 °C között állapították meg mesterséges tápközegben folytatott kísérleteik során.

A legnagyobb sejtszámot a réti agyagtalajnál kaptuk. Mint ahogy az 1. táblázatból látható, ennek a talajnak a humusztartalma eléri a 6 %-ot. A nagy humusztartalom, mint arra ROUGHLEY [12] és VAN SCHREVEN [14] rámutattak, jóval hosszabb ideig képes megvédeni a rhizobiumokat a környezeti faktork káros hatásaival szemben, mint a kisebb mennyiségű szerves anyagot tartalmazó talajok. Feltételezhető az is, hogy ilyen esetben szerepet játszik az, hogy

a szervesanyag mennyiségével párhuzamosan növekszik a talajkolloidok által adszorbeált növekedési faktorok mennyisége.

A 45 °C-os hőmérséklet igen erősen csökkenti a rhizóbiumok számát az összes vizsgált talajtípusban. BOWEN és KENNEDY [6] hasonló sejtpusztulási arányt figyeltek meg 40 °C-os hőmérsékleten mind a *Rhizobium lupini*, mind pedig a *Rhizobium meliloti* esetében. MARSHALL [10] szerint a *Rhizobium meliloti* a száraz szürke és sárga színű homok talajokban a felmelegítés hatására csak 70 °C-on pusztul el, míg a vörös színű homokban és a kötött talajokban bizonyos ideig még ilyen hőmérséklet mellett is megmarad.

PIPER [11] és ABD EL HAFEZ [1] szerint a hőmérséklet 62 °C-ot is elérhet egyes homok talajok felszínén különösen a meleg égvövi zónában. Ilyen hőmérsékleti értékek már alapvető mértékben meghatározhatják a *Rhizobium phaseoli* előfordulását. Véleményünk szerint a magas hőmérséklet azok közé az ökológiai tényezők közé tartozik, amelyek szerepet játszhatnak abban, hogy a bab növény gyökérzetén nem képződnek gumók egyiptomi talajokban.

A kísérletek azt bizonyítják, hogy a *Rhizobium phaseoli* optimális hőigénye, hasonlóan a szintetikus táptalajok alkalmazásakor megfigyeltekhez, talajviszonyok között is 30 °C körül van. A nagy humusztartalom bizonyos fokú védettséget biztosított a baktériumnak a magas (45 °C) hőmérséklet kedvezőtlen hatásával szemben.

Összefoglalás

A szerzők a *Rhizobium phaseoli* baktérium szaporodásának intenzitását tanulmányozták, modell kísérletben a különböző hőmérsékleti értékek (20–30–45 °C) függvényében. A kísérletet néhány alapvető magyarországi talajtípussal folytatták le steril körülmények között.

A kísérletbe vont steril talajokban 20–30 °C-os hőmérsékleti körülmények között a sejtszám a 4–6 hetekben érte el a maximumát, utána fokozatosan csökkent a kísérleti periódus végéig. A *Rhizobium phaseoli* szaporodási intenzitásának optimuma az összes talajtípusok esetében 30 °C körül volt.

A legmagasabb sejtszámot a nagy humusztartalmú réti talajnál kaptuk.

A magas hőmérsékleten (45 °C) történő inkubáció az összes talajtípusokban gátolta a *Rhizobium phaseoli* szaporodását. Feltételezhető, hogy a bab gumóképzésének elmaradásánál az egyiptomi talajokban a magas hőmérséklet is közrejátszik. Ugyanis nyári hónapokban a talajhőmérséklet jelentős értéket érhet el. A talaj humusztartalma bizonyos fokú rezisztenciát biztosít a magas hőmérséklet káros hatásával szemben.

Irodalom

- [1] ABD EL-HAFEZ, A. M.: Seasonal variations of soil microflora and its effect on soil nitrogen. M. Sc. Thesis, Ain Shams Univ. Cairo. 1962.
- [2] ABOU EL-FADL, M., et al.: An analysis of some factors affecting root nodules formation of garden bean in Egypt. Agric. Res. Rev., **41**, 37–58. 1963.
- [3] ALLEN, E. K. & ALLEN, O. N.: Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia. Bact. Rev. **14**, 273–330. 1950.
- [4] ALLEN, O. N.: Experiments on soil microbiology. Burgess Publ. Minnesota. 1958.
- [5] ALLISON, F. E., HOOVER, S. R. & MINOR, F. W.: Biochemical nitrogen fixation studies. Botan. Gaz. **104**, 63–71. 1942.
- [6] BOWEN, G. D. & KENNEDY, M. M.: Effect of high soil temperature on Rhizobium. Qd. J. Agric. Sci. **16**, 177–197. 1959.
- [7] FRED, E. B., BALDWIN, L. L. & MCCOY, E.: Root nodule bacteria and leguminous plants. Univ. Wisconsin. Studies in Science. **5**, 343. 1932.

- [8] LOTFI, M. & FAHMY, M.: A new powdered type legume inoculant. *Agric. Res. Rev.* **36**. 325—330. 1958.
- [9] MAHMOUD, S. A. Z., TAHA, S. M. & SALEM, S. H.: Nagy teljesítőképességű *Rhizobium phaseoli* törzsek izolálásának módszerei. *Agrokémia és Talajtan.* **19**. 329—338. 1970.
- [10] MARSHALL, K. C.: Survival of root nodule bacteria in dry soils exposed to high temperatures. *Aust. J. Agric. Res.* **15**. 273—281. 1964.
- [11] PIPER, C. S.: Soil and plant analysis. Univ. Adelaide. Australia. 1947.
- [12] ROUGHLEY, R. J.: Some factors influencing the growth and survival of root nodule bacteria in peat culture. *J. Appl. Bact.* **31**. 259—265. 1968.
- [13] SALEM, S. H.: Microbiological studies on nodule bacteria Ph. D. Thesis, Ain Shams Univ. Cairo. 1969.
- [14] VAN SCHREVEN, D. A.: Factors affecting growth and survival of *Rhizobium* spp. *Plant and Soil.* **32**. 113—130. 1970.

Érkezett: 1971. május 5.

Growth and Survival of *Rhizobium phaseoli* at Different Temperatures in some Hungarian Soil Types

S. H. SALEM and J. SZEGLI

Ain Shams University, Bacteriological Department, Faculty of Agriculture, Cairo (UAR) and Research Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Summary

The growth rate of an effective strain of *Rhizobium phaseoli* was studied in model experiment at different temperatures (20—30—45 °C), in some Hungarian soil types under sterilized conditions.

The growth rate of *Rhizobium phaseoli* in the soils studied reached its maximum in the 4th or 6th week when incubated at 20—30 °C, afterwards it gradually decreased till the end of the experimental period. The growth rate of *Rhizobium phaseoli* incubated at 20 °C was generally lower than that incubated at 30 °C. The optimum temperature for the growth intensity of *Rhizobium phaseoli* in most of the soil types was found to be 30 °C.

The maximum growth rate was obtained in meadow soil containing the highest percentage of organic humus (6%).

Incubation at high temperature (45 °C) limited the growth of *Rhizobium phaseoli* in all of the soil types. It could be stated that high temperature is one of the reasons that limits or hampers the nodule formation in bean plant growing in Egyptian soils. Such soils are always subjected to high temperature, especially in summer.

The humus content of the soil may enable the *Rhizobium phaseoli* to resist — to some extent — the harmful effect of high temperature.

Table 1. Chemical characteristics of soils studied. (1) Soil types (see Fig. 1. A—D). (2) Humus %. (3) Total N %. (4) Available P₂O₅ and K₂O mg/100 g soil.

Fig. 1. Cell count of *Rhizobium phaseoli* in some Hungarian soil types. A) Calcareous chernozem. B) Brown forest soil. C) Pseudogley, brown forest soil. D) Heavy textured meadow soil. Vertical axis: Number of *Rhizobium phaseoli* in the soil, (million/g). Horizontal axis: duration of the incubation (in weeks).

La prolifération de *Rhizobium phaseoli* aux différentes températures dans quelques types de sol de Hongrie

S. H. SALEM et J. SZEGLI

Chaire de Bactériologie de la Faculté d'Agronomie, Université Ain Shams, Le Caire, RAU, et Institut de Recherches de Pédologie et de Chimie Agricole de l'Académie des Sciences de Hongrie, Budapest

Résumé

Dans des expériences modèles, l'intensité du développement du *Rhizobium phaseoli* a été étudiée en fonction de différentes températures (20—30—45 °C) dans des conditions stériles, en employant certains types de sol fondamentaux de Hongrie.

Dans les sols examinés, le nombre des bactéries incubées aux températures de 20—30 °C, a atteint son maximum après 4 à 6 semaines, décroissant ensuite jusqu'à la fin de la période d'observation.

Au cas de tous les types de sol, le développement optimum de *Rhizobium phaseoli* s'est montré à une température d'environ 30 °C. Le nombre des bactéries était la plus haute dans le sol de prairie à forte teneur en humus (6%).

L'incubation à une haute température (45 °C) a limité la prolifération du *Rhizobium phaseoli* dans tous les types de sol. Il est à assumer que la haute température est une des causes inhibant la formation des nodosités sur les racines d'haricots dans les sols d'Égypte qui sont exposés à l'effet de la chaleur surtout en été. La teneur en humus du sol assure une certaine résistance à l'effet nuisible de la haute température.

Tableau 1. Analyse chimique des échantillons des sols employés pour les essais microbiologiques. (1) Types de sol (A—D voir Fig. 1). (2) Humus, %. (3) N total, %. (4) P_2O_5 et K_2O facilement assimilables, mg/100 g de sol.

Fig. 1. Nombre des cellules de *Rhizobium phaseoli* dans quelques sols de Hongrie. A) Tchernozem à enduite calcaire. B) Sol brun lessivé de forêt. C) Sol brun lessivé à pseudogley. D) Sol de prairie argileux. Axe verticale: Nombre de *Rhizobium* en millions/gramme de sol. Axe horizontale: Période d'incubation, semaines.

Размножение *Rhizobium phaseoli* в некоторых почвах Венгрии в различных температурных условиях

САЛЕМ С. Х. и И. СЕГИ

Кафедра Микробиологии Сельскохозяйственного Факультета Университета Айн Шамс, Каир. О. А. Р. и Научно-исследовательский Институт Почвоведения и Агрохимии АН Венгрии, Будапешт

Резюме

Авторами в модельных опытах изучалась интенсивность размножения бактерий *Rhizobium phaseoli* в зависимости от температуры (20—30—45°C). Опыты проводились на некоторых основных почвенных типах Венгрии в стерильных условиях.

В опытных стерильных почвах при температуре 20—30°C за 4—6 недель количество клеток достигало своего максимума, затем постепенно снижалось к концу опытного периода. Оптимальная интенсивность размножения *Rhizobium phaseoli* на всех типах почвы наблюдалась при температуре около 30°.

Самое большое число клеток отмечалось в луговой почве с высоким содержанием гумуса.

Инкубация при высокой температуре (45°C) на всех почвах тормозила размножение *Rhizobium phaseoli*.

Можно предполагать, что причина отставания образованию клубеньков на корнях фасоли на египетских почвах отчасти скрывается и в высокой температуре, ибо в летних месяцах температура почвы достигает здесь высоких величин.

Содержание гумуса в почве до определенной степени обеспечивает резистентность против неблагоприятного влияния высоких температур.

Рис. 1. Изменение числа клеток *Rhizobium phaseoli* в некоторых почвах Венгрии A) Мицелярный чернозем. B) Бурая лесная почва. C) Псевдоглеевая бурая лесная почва. D) Луговая глинистая почва. На вертикальной оси: Количество клеток клубеньковых бактерий в млн/г почвы. На горизонтальной оси: Инкубационный период в неделях.

Табл. 1. Данные химических анализов почвы, используемой для микробиологических опытов. (1) Название почвы. (от А до D смотри на рисунке 1). (2) Гумус в %. (3) Общий азот в %. (4) Легкоусвояемые P_2O_5 и K_2O .